

Efeitos da substância de alarme no teste claro/escuro no Zebrafish, *Danio rerio*

Bruno de Matos Mansur¹, Bruno Rodrigues dos Santos², Amauri Gouveia Jr³

1. Psicólogo, Mestrando em Teoria e Pesquisa do Comportamento (Ectoetologia), Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento (NTPC), Universidade Federal do Pará, Brasil. E-mail: bmmansur@hotmail.com

2. Psicólogo, Mestre em Psicologia do Desenvolvimento e Aprendizagem, Doutorando do Núcleo de Teoria e Pesquisa do Comportamento (NTPC), Universidade Federal do Pará, Brasil. E-mail: brs.email@gmail.com

3. Psicólogo, Mestre em Psicologia Experimental, Doutor em Neurociências e Comportamento, Brasil. E-mail: gouveiajr.a@gmail.com

RESUMO: O Zebrafish é um animal experimental que tem se mostrado útil em várias áreas de pesquisa do comportamento, incluindo estados afetivos relacionados ao estresse. A substância de alarme é conhecida por eliciar respostas de estresse, sendo portanto uma ferramenta para investigar as bases biológicas do medo. O teste claro escuro, por sua vez, é a ferramenta para investigar o papel da substância de alarme como sinalizador de comportamentos de ansiedade, alterando o padrão de preferência claro/escuro. Foram utilizados 21 animais adultos, experimentalmente ingênuos, da espécie *Danio rerio* e sexo indeterminado, divididos em três grupos de sete: grupo controle; tratamento agudo e tratamento crônico. No grupo crônico houve administração de substância de alarme durante 10 dias; no grupo agudo, a solução conteve substância de alarme somente no décimo dia. O teste Claro/Escuro foi aplicado antes e depois da exposição dos animais ao tratamento. O teste claro escuro não detectou mudanças nos comportamentos de permanência no lado claro, alternância e latência nos sujeitos da espécie *Danio rerio* expostos aguda e cronicamente à substância de alarme. Contudo, a análise gráfica aponta que a substância de alarme altera os padrões de preferência claro/escuro, havendo aumento da ansiedade nos grupos agudo e crônico, principalmente no grupo crônico.

Palavras-chave: comportamento, ansiedade, estresse, reação de alarme.

Effects of alarm substance in the chiaroscuro test in the Zebrafish, *Danio rerio*

ABSTRACT: The Zebrafish is an experimental animal that has proven useful in several areas of behavior research, including affective conditions related to stress. The alarm substance is known to elicit stress responses and is therefore a tool to investigate the biological basis of fear. The chiaroscuro test, in turn, is a tool to investigate the role of alarm substance as an indicator of anxiety behaviors, changing the pattern of light and dark preference. We used 21 adult animals, experimentally naive, *Danio rerio* and species indeterminate sex, divided into three groups of seven: control group; acute treatment and chronic treatment. In the chronic group, there was alarm substance administration for 10 days; the acute group, the solution contained alarm substance only on the tenth day. The chiaroscuro test was applied before and after exposure of animals to treatment. The chiaroscuro test did not detect changes in behavior to remain on the light side, and switching latency in individuals of the species *Danio rerio* acute and chronically exposed to alarm substance. However, the graphical analysis indicates that the alarm substance alters the preference patterns of light and dark, with increased anxiety in the acute and chronic groups, especially in the chronic group.

Keywords: behavior, anxiety, stress, alarm reaction.

1. Introdução

O estresse é uma reação fisiológica que ocorre quando o organismo tem sua homeostase ameaçada. O conceito de estresse baseia-se na observação de que diferentes tipos de condições físicas ou psicológicas que ameaçam a homeostase do organismo eliciam o mesmo conjunto de alterações corporais. Este conjunto de reações corporais foi denominado por Selye (1936) de síndrome de adaptação geral. Durante a resposta de estresse ocorre a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e de corticoides na corrente sanguínea, havendo ativação do eixo pituitária-adrenal e simpaticomedularadrenal.

O zebrafish, de acordo com Gaikwad et al., é um modelo útil para o estudo de estados afetivos

relacionados ao estresse, que ocorre em situações nas quais o organismo encontra-se exposto a danos físicos, ou estímulos psicológicos, como novidade, sinais de punição consequente ou ausência de recompensa esperada.

De acordo com Ide, Urbinati & Hoffmann, os estudos sobre as respostas comportamentais e fisiológicas de peixes expostos à substância de alarme são escassos, no entanto, peixes da família Cyprinidae, a mesma do *Danio rerio*, como *Phoxinus phoxinus* (L). apresentaram bradicardia e o *Semotilus margarita* apresentou aumento nos níveis de glicose e cortisol plasmáticos, o que caracteriza a substância de alarme como um eliciador de respostas de estresse, provocando a síndrome de adaptação geral.

Reação de alarme

As reações de alarme são especializações adaptativas comportamentais apresentadas por animais de hábito social, as quais visam à proteção contra predadores. A reação de alarme ocorre na maioria dos peixes devido à captação da substância de alarme pelo sistema olfativo. Geralmente a substância é liberada pela pele de sujeitos feridos, causando uma reação de medo em indivíduos espacialmente próximos, além disso, há um aumento no comportamento de vigília. Por isso a pele destes peixes contém substâncias capazes de eliciar uma resposta clássica de medo. A substância é produzida por espécies da superordem Ostariophsy e é armazenada nas células claviformes da epiderme, sendo constituída de hipoxantina-3-n-óxido, entretanto, estudos apontam que qualquer substância composta pelo grupo funcional óxido de nitrogênio parece funcionar como agente potencial de alarme.

Durante a reação de alarme os peixes inicialmente agregam-se, alternando movimentos rápidos e circulares, com paradas bruscas, sacudindo-se bruscamente para confundir o predador, segue-se então o deslocamento dos indivíduos para direções aleatórias. Após um período de tempo os peixes permanecem mais agregados na região central e no fundo do aquário, procurando distanciar-se da região de introdução do alarme. Duboc cita este comportamento como uma tática de evasão seguida de busca por esconderijo. Devido a possibilidade deste complexo comportamento ser estimulado em laboratório, Suresh, Jesuthasan e Mathuru, propõem a reação de alarme como uma poderosa ferramenta para investigar as bases biológicas do medo em vertebrados.

Ansiedade

Segundo McNaughton e Corr, a ansiedade é vista como sendo gerada na maioria das vezes por ativações concorrentes e equivalentes do medo e sistemas de abordagem de risco, com o sistema inibidor comportamental agindo para acessar o risco e aumentar a aversão ao risco em situações de conflito. Ainda de acordo com McNaughton e Corr (2004), existem comportamentos que retiram um animal de uma fonte de perigo e outros, que por sua vez, permitem sua aproximação de uma situação ameaçadora. Estas funções são executadas por sistemas neurais paralelos, um controlando medo e outro a ansiedade, respectivamente. Existe também uma hierarquia funcional relacionada à distância percebida de determinada ameaça. Essa hierarquia aplica-se igualmente ao medo e ansiedade e em cada caso é mapeado no nível neural que controla o comportamento. Pequenas distâncias defensivas são localizadas em estruturas mais caudais e subcorticais enquanto distâncias maiores são mais rostrais e corticais.

Essas distâncias maiores, em que se registram atividades rostrais e corticais são as áreas mais envolvidas em testes como a caixa claro/escuro, no qual

a ameaça é a exposição a uma área ansiogênica. O telencéfalo de peixes teleósteos foi sugerido como homólogo do sistema límbico de mamíferos, e há alguma evidência de que o telencéfalo dorsomedial é funcionalmente equivalente a amígdala dos mamíferos.

Teste claro escuro

Testes baseados no paradigma da novidade, como o teste claro/escuro são comumente utilizados em neurociência comportamental para o estudo de medo e ansiedade, sendo que em geral, administrações de drogas ansiolíticas aumentam o tempo que o animal gasta no compartimento claro, enquanto drogas ansiogênicas diminuem esse tempo. A preferência claro-escuro com o peixe *Carassius auratus* já passou da fase de validação comportamental realizada a partir da utilização de aquários branco-branco e preto-preto em contraste ao de duas cores. No experimento de Gouveia Jr et al ocorreu a validação comportamental do teste claro/escuro sobre o peixe *C. auratus*. Neste estudo a maioria dos peixes passou mais tempo do lado escuro (14 de 17). O padrão comportamental exibido pelo peixe neste experimento deve indicar um conflito entre a tendência de buscar proteção e a tendência de explorar um novo ambiente, onde comida, e parceiros sexuais podem ser encontrados.

Este estudo pretende verificar se o teste da caixa Claro/Escuro é sensível às alterações provocadas pela exposição à substância de alarme e se existe habituação da resposta no caso de estresse crônico.

2. Material e Métodos

Sujeitos

Um total de 21 peixes adultos, experimentalmente ingênuos, da espécie *Danio rerio* e de sexo indeterminado foram adquiridos em um pet shop local. Estes peixes foram divididos em três grupos de sete, sendo um grupo controle, um grupo para o tratamento agudo com substância de alarme e outro grupo para o tratamento crônico com substância de alarme. Cada grupo era mantido em um tanque de vidro (32x34x67 altura, largura e comprimento) durante 15 dias para aclimação, com exposição controlada à luz, num ciclo de 12/12h iniciado às 06h 30 min da manhã. O pH médio foi mantido em 6.8 e a temperatura manteve-se constante em 22°C. Os peixes eram alimentados uma vez por dia com ração (Color Tetra GmßH, Germany), sempre uma hora antes do teste. O experimento foi conduzido no laboratório de neurociências e comportamento, no núcleo de teoria e pesquisa do comportamento da universidade federal do Pará e o manejo dos animais foi de acordo com as diretrizes para a conduta ética no cuidado e uso de animais (Committee on Animal Research and Ethics).

Procedimento e Desenho experimental

Para verificar se o teste da caixa Claro/Escuro é sensível às alterações provocadas pela exposição à substância de alarme, foi desenvolvido o seguinte desenho:

Primeiramente todos os sujeitos foram submetidos ao teste Claro/Escuro, para posterior comparação com o teste Claro/Escuro final. Em seguida, foi administrada ao longo de dez dias uma solução de 5 ml, durante 5

minutos em cada sujeito isolado. No grupo crônico, a solução conteve estrato de pele durante todos os dias; no grupo agudo, a solução conteve estrato de pele somente no décimo dia, nos nove dias anteriores e no grupo controle foi adicionado somente 5 ml de água do próprio aquário experimental, sem substância de alarme. No décimo dia, imediatamente após a exposição dos animais ao tratamento, o segundo teste Claro/Escuro foi aplicado.

Tabela 1. Esquema com o regime de tratamento dos sujeitos.

Controle	Teste Claro/Escuro	10 dias de exposição hídrica	Teste Claro/Escuro
Agudo	Teste Claro/Escuro	Exposição à substância de alarme somente no décimo dia	Teste Claro/Escuro
Crônico	Teste Claro/Escuro	10 dias de exposição à substância de alarme	Teste Claro/Escuro

Substância de alarme

A substância de alarme foi preparada com a pele de dez sujeitos da espécie *Danio rerio*, para 100 ml de substância, utilizando método adaptado de Ide, Urbinati e Hoffmann. Os sujeitos eram retirados dos aquários e então desnervados por seção medular ânterodorsal. Em seguida a pele era removida delicadamente pela inserção de uma tesoura, que a removia completamente, a partir do orifício aberto pela decapitação. A pele extraída era lavada com água destilada e em seguida colocada em um gral, aonde era macerada, com adição de água destilada para amolecer a pele, até tornar-se aparentemente liquefeita.

O extrato bruto de pele foi retirado antes do primeiro dia de sessão, sendo que a porção não utilizada foi armazenada em pipetas e congelada à -10 °C, sendo descongelada e imediatamente utilizada nas sessões posteriores.

Exposição

Os peixes eram colocados individualmente em aquários de vidro (13 x 10 x 8), sendo que a reação de alarme era estimulada nas sessões pela introdução de 5 ml da solução no aquário experimental, que era cuidadosamente injetada em um dos cantos superiores do aquário experimental com uma seringa de 3 ml. A solução controle era a água do próprio aquário experimental, retirada minutos antes de cada teste e mantida à mesma temperatura.

Exposição

Os peixes eram colocados individualmente em aquários de vidro (13 x 10 x 8), sendo que a reação de alarme era estimulada nas sessões pela introdução de 5 ml da solução no aquário experimental, que era cuidadosamente injetada em um dos cantos superiores

do aquário experimental com uma seringa de 3 ml. A solução controle era a água do próprio aquário experimental, retirada minutos antes de cada teste e mantida à mesma temperatura.

Aparato do teste Claro/Escuro

No experimento foram utilizados três aquários de acrílico, cada um de dimensões: 10 x 45 x 15 cm, sendo que metade de seu comprimento (22,5 cm) era negro e a outra metade (22,5) era branco, ambos opacos. No aquário havia duas barreiras centrais de contenção, da mesma cor do tanque, formando um espaço de 15 x 10 x 10 cm, aonde os peixes eram colocados cinco minutos antes do início das sessões para habituação. A coluna de água no experimento era mantida a 10 cm.

Os tanques eram rotacionados 180° após cada sessão, para eliminar variáveis estranhas decorrentes da localização espacial dos tanques e orientação espacial. Os aquários foram iluminados por duas lâmpadas mantidas a 30 cm de altura do aquário, uma do lado negro e outra do lado branco.

Experimento

Após a introdução de substância de alarme ou água, os peixes foram colocados individualmente na área central de contenção do aparato para cinco minutos de habituação, após este período a contenção foi removida, possibilitando a livre movimentação do animal pelos compartimentos negro e branco durante 15 minutos. A sessão foi integralmente filmada, sendo o vídeo posteriormente analisado, possibilitando a transcrição das variáveis analisadas: Primeira latência, Tempo no lado claro e no escuro e o Número de alternâncias. Os testes foram aplicados sempre entre 12 e 17 horas.

Análise estatística

As frequências de cada variável analisada passaram pelo teste de análise de variância com medidas repetidas, comparando o desempenho dos sujeitos antes e depois da exposição a substância de alarme. Os dados não paramétricos foram analisados por seu equivalente ranqueado, o teste de Friedmann. O valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo e todas as análises estatísticas foram feitas com o software SigmaStat 3.1.

3. Resultados

A análise não mostrou diferenças estatísticas significativas entre grupos nas três variáveis analisadas: Tempo no lado claro; alternância e latência. (Vide tabela 2).

Os gráficos mostram que os grupos agudo e crônico comportaram-se de maneira muito semelhante em relação ao grupo controle, nos dois dias de teste na caixa claro escuro.

Tabela 2. Resultado do teste estatístico comparando sujeitos antes e depois do tratamento, utilizando Anova com medidas repetidas ou teste de Friedmann. DF= grau de liberdade; SS= soma dos quadrados; MS= média dos quadrados.

Média					
	DF	SS	MS	F	P
Ctrl	Chi-square= 1,286 with 1 DF. P(est.)= 0,257 P(exact)= 0,453				
Agudo	1	59020,07	59.020	2	0,204
Crônico	1	54188,64	54188,64	4,663	0,074
Alternância					
	DF	SS	MS	F	P
Ctrl	1	604,571	604,571	2,38	0,174
Agudo	Chi-square= 0,143 with 1 DF. P(est.)= 0,705 P(exact)= 1,000				
Crônico	1	7731,5	7731,5	4,143	0,088
Latência					
	DF	SS	MS	F	P
Ctrl	1	121831,1	121831,1	1,193	0,317
Agudo	Chi-square= 1,286 with 1 DF. P(est.)= 0,257 P(exact)= 0,453				
Crônico	1	133868,6	133868,6	3,323	0,118

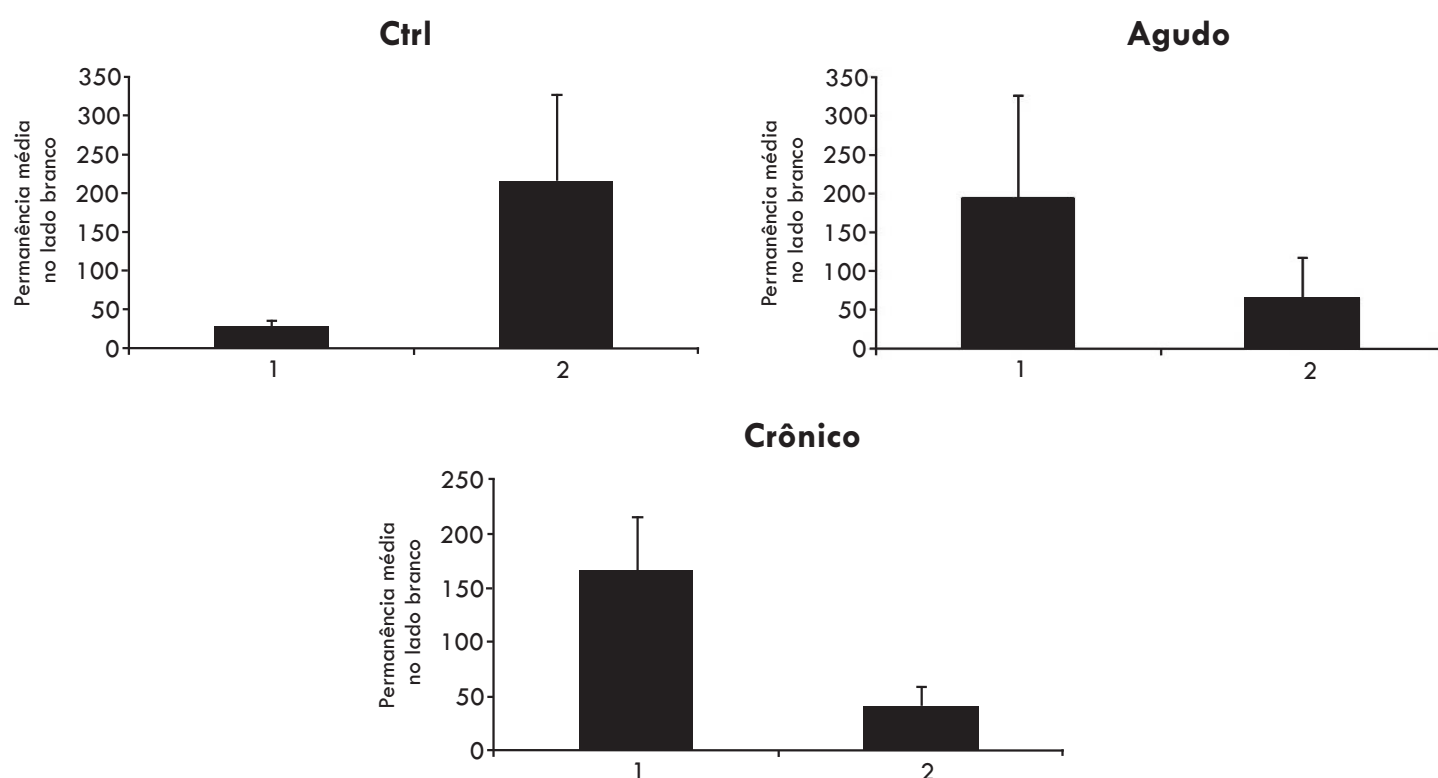


Figura 1. A figura mostra o tempo médio de permanência no lado claro, entre os sete sujeitos (eixo y), em uma sessão de novecentos segundos, nos grupos controle, agudo e crônico. O eixo x mostra os dias de sessão (primeiro e décimo).

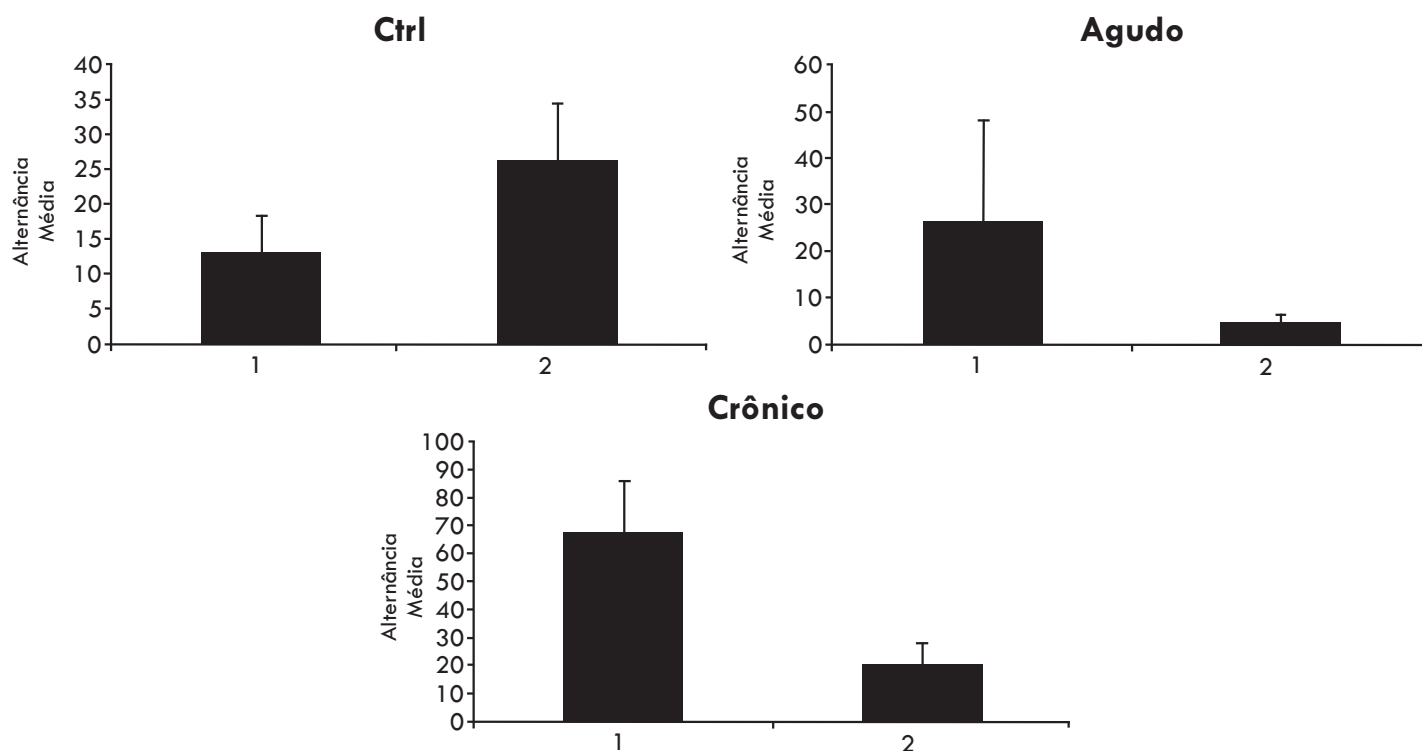


Figura 2. A figura mostra o número de médio de alternâncias dos sete sujeitos (eixo y) em uma sessão de novecentos segundos, nos grupos controle, agudo e crônico. O eixo x mostra os dias de sessão (primeiro e décimo).

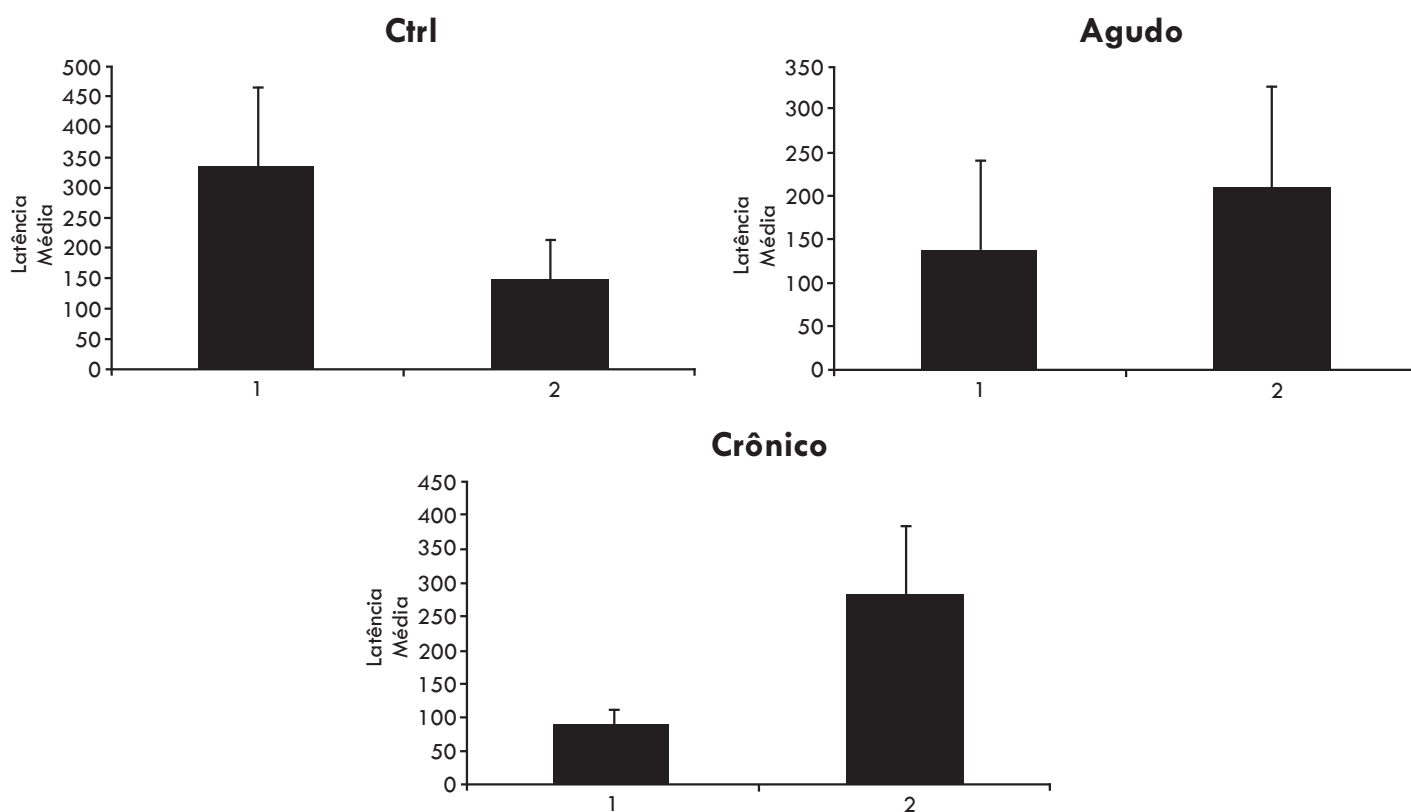


Figura 3. A figura mostra o tempo de médio de latência da primeira escolha dos sete sujeitos (eixo y) em uma sessão de novecentos segundos, nos grupos controle, agudo e crônico. O eixo x mostra os dias de sessão (primeiro e décimo).

4. Discussão

Neste trabalho, colocamos o zebrafish em um recipiente com estimulação aversiva estressante, um estrato de pele contendo substância de alarme, durante determinado tempo e depois os testamos na caixa preto e branco para verificar possíveis alterações, como por exemplo, se ocorria aumento de ansiedade devido à exposição à estressores ou se a exposição prolongada causa habituação, já que o sujeito aprende que vai ser punido durante a exposição crônica e acostuma-se, não alterando de forma efetiva seu comportamento. Apesar dos testes estatísticos não apontarem nenhuma diferença significativa, os dados e a análise gráfica parecem apontar que a substância de alarme altera os padrões de preferência claro/escuro, havendo efeito tanto de habituação no grupo controle, quanto de aumento da ansiedade nos grupos agudo e crônico, principalmente no grupo crônico.

Nos gráficos, podemos perceber que tanto no tratamento crônico quanto no agudo, existe uma diminuição da permanência média dos sujeitos no lado claro, após a administração do tratamento com substância de alarme. Como podemos ver, na tabela 2, o grupo crônico exibe um valor bem baixo de probabilidade da hipótese nula estar correta ($p=0,074$). Em contrapartida, no grupo controle, após os 10 dias de intervalo entre testes, a permanência no lado claro aumentou, o que parece apontar habituação ao experimento, o que ocorre em níveis menores de ansiedade.

Algo semelhante ocorreu quanto ao número médio de alternâncias, que diminuiu bastante após administração do tratamento nos grupos agudo e crônico. Isto parece indicar a propriedade ansiogênica da substância de alarme sendo detectada pelo teste. O menor número de alternâncias é um reflexo direto do maior tempo de permanência dos sujeitos no lado escuro. Novamente o teste estatístico não detectou diferenças significativas, com valores de $p \leq 0.05$, no entanto o valor de p também foi muito baixo nesta variável, apontando $p=0,088$ no grupo crônico. O grupo controle, por sua vez, apontou um aumento no número de alternâncias, o que parece indicar um menor nível de ansiedade dos sujeitos, que deslocam-se mais livremente durante o experimento, acessando a área clara da caixa claro/escuro.

A análise dos gráficos do tempo médio de latência da primeira escolha dos sujeitos também corrobora com os dados analisados nas demais variáveis. Os sujeitos que passaram por tratamento crônico ou agudo com a substância de alarme registraram um aumento da latência após a administração da dose. O aumento da latência, ou tempo que o sujeito demora para acessar o lado branco pela primeira vez é um indicador de ansiedade. O grupo controle, após os 10 dias de intervalo entre teste, apresentou uma diminuição na

latência, apontando para habituação ao teste e diminuição de ansiedade.

Nenhuma das variáveis analisadas apresentou significância estatística, o que pode apontar para a hipótese, de que os sujeitos sofreram habituação ao esquema de tratamento, pois segundo Castilho, Pottinger e Volpato, animais expostos por longos períodos a estressores químicos ou físicos normalmente apresentam habituação, mesmo na presença do estímulo, entretanto, os sujeitos expostos à dose aguda também não apresentaram nenhuma alteração comportamental quando expostos pela primeira vez à substância de alarme. De acordo com Suresh, Jesuthasan e Mathuru (2008) na ausência de outros peixes, a substância de alarme faz com que o peixe evite a área em que encontrou a substância. Talvez os sujeitos tenham se comportado normalmente neste experimento simplesmente pela substância de alarme estar ausente do aquário teste, o que sinalizaria que o sujeito estaria seguro, mesmo com a exposição crônica e aguda pouco tempo antes da sessão experimental, funcionando a substância de alarme não só como um estímulo sinalizador de perigo e eliciador de medo, mas sua ausência também funcionaria como um sinalizador de segurança. A ausência de mudanças comportamentais significativas na caixa claro escuro não quer dizer de forma alguma uma ausência de efeito da substância de alarme, mas sim que os efeitos da substância de alarme parecem ser imediatos, fornecendo ao sujeito pistas sobre seu ambiente.

5. Conclusão

O teste claro escuro não detectou mudanças nos comportamentos de permanência no lado claro, alternância e latência nos sujeitos da espécie *Danio rerio* expostos aguda e cronicamente à substância de alarme, contrariando o comportamento esperado para a espécie. Entretanto, considerando um valor de $p \leq 0.05$. Se considerássemos um valor de $p \leq 0.09$, encontraríamos diferenças nas variáveis tempo no lado claro e alternância no grupo com tratamento crônico. Resultados negativos não significam ausência de efeito. A análise gráfica também aponta indícios de que a substância de alarme pode alterar os padrões de preferência claro/escuro, havendo aumento da ansiedade nos grupos agudo e crônico, principalmente no grupo crônico.

6. Referências Bibliográficas

- BROWN, G. E.; ADRIAN, J. C.; SMYTH, E.; LEET, H.; BRENNAN, S. Ostariophysan alarm pheromones: Laboratory and field tests of the functional significance of nitrogen oxides. *Journal of Chemical Ecology*, v. 26, p. 139-154. 2000.
- CASTILHO, M. F.; POTTINGER, T. G.; VOLPATO, G. L. Chronic social stress in rainbow trout: does it promote physiological habituation? *General and comparative endocrinology*, v. 155, n. 1, p. 141-7, 1 jan. 2008.

- CASTILHO, M. F.; POTTINGER, T. G.; VOLPATO, G. L. Chronic social stress in rainbow trout: does it promote physiological habituation? **General and comparative endocrinology**, v. 155, n. 1, p. 141–7, 1 jan. 2008.
- DUBOC, L. F. Análise comparativa e aspectos ecológicos da reação de alarme em duas espécies de Mimagoniastes (Ostariophysi, Characidae, Glandulocaudinae) Luiz. **revista brasileira de zoologia**, v. 24, n. 4, p. 1163–1185, 2007.
- FLOOD, N. C.; OVERMIER, J. B.; SAVAGE, G. E. Teleost telencephalon and learning: an interpretive review of data and hypotheses. **Physiology & behavior**, v. 16, n. 6, p. 783–8, jun. 1976.
- GAIKWAD, S. et al. Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: the utility of fish models to study stress-memory interplay. **Behavioural processes**, v. 87, n. 2, p. 224–30, jul. 2011.
- GOULART, V. D. L. R. **IMPORTÂNCIA DA QUÍMICA DE ALARME NO COMPORTAMENTO ANTIPREDATÓRIO DO LAMBARI, *Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758 - (Pisces: Characidae) Dissertação**. [s.l.] Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, 2010.
- GOUEIA JR, A. et al. Preference of Goldfish (*carassius auratus*) for dark places. **Revista de Etologia**, v. 7, n. 351317, p. 63–66, 2005.
- GRAEFF, F. G. Ansiedade , pânico e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal Anxiety , panic and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Revista brasileira de psiquiatria**, v. 29, p. 3–6, 2007.
- GROSSMAN, L. et al. Characterization of behavioral and endocrine effects of LSD on zebrafish. **Behavioural brain research**, v. 214, n. 2, p. 277–84, 25 dez. 2010.
- IDE, L. M.; URBINATI, E. C.; HOFFMANN, A. The role of olfaction in the behavioural and physiological responses to conspecific skin extract in *Brycon cephalus*. **Journal of Fish Biology**, v. 63, n. 2, p. 332–343, ago. 2003.
- JESUTHASAN, S. J.; MATHURU, A. S. The alarm response in zebrafish: innate fear in a vertebrate genetic model. **Journal of neurogenetics**, v. 22, n. 3, p. 211–28, jan. 2008.
- MAXIMINO, C. et al. Parametric analyses of anxiety in zebrafish scototaxis. **Behavioural Brain Research**, v. 210, n. 1, p. 1–7, 2010.
- MCNAUGHTON, N.; CORR, P. J. A two-dimensional neuropsychology of defense: fear/anxiety and defensive distance. **Neuroscience and biobehavioral reviews**, v. 28, n. 3, p. 285–305, maio 2004.
- PORTAVELLA, M.; TORRES, B.; SALAS, C. Avoidance response in goldfish: emotional and temporal involvement of medial and lateral telencephalic pallium. **The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 24, n. 9, p. 2335–42, 3 mar. 2004.
- SALAS, C. et al. Neuropsychology of Learning and Memory in Teleost Fish. **Zebrafish**, v. 3, n. 2, p. 157–171, 2006.
- SACKERMAN, J.; DONEGAN, J. J.; CUNNINGHAM, C. S.; NGUYEN, N. N.; LAWLESS, K.; LONG, A.; et al. Zebrafish behavior in novel environments: effects of acute exposure to anxiolytic compounds and choice of *Danio rerio* line. **International Journal of Comparative Psychology**, v. 23, p. 43–61. 2010.
- SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 1–32. 1936.
- SPEEDIE, N.; GERLAI, R. Alarm substance induced behavioral responses in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural brain research**, v. 188, n. 1, p. 168–77, 17 mar. 2008.
- WONG, K. et al. Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). **Behavioural brain research**, v. 208, n. 2, p. 450–7, 2 abr. 2010.